




IDENTIFICATION OF ANTIGEN, ASSAY THEREOF AND VACCINE CONTAINING SAID ANTIGEN**Publication number:** JP2002399**Publication date:** 1990-01-08**Inventor:** BAANAADO FURANSHISU ZABIAA GAN;
DAAMOTSUTO FUERITSUKUSU JIERAA**Applicant:** GALWAY G GENE LTD**Classification:**

- international: A61K39/245; A61K39/395; A61P31/12; C07K7/06;
C07K7/08; C07K14/00; C07K14/05; C12N1/20;
C12N15/10; C12P21/02; C12Q1/68; C12Q1/70;
G01N33/569; A61K38/00; C12R1/19; A61K39/245;
A61K39/395; A61P31/00; C07K7/00; C07K14/00;
C07K14/005; C12N1/20; C12N15/10; C12P21/02;
C12Q1/68; C12Q1/70; G01N33/569; A61K38/00; (IPC1-
7): A61K39/245; A61K39/395; C07K7/06; C07K7/08;
C07K7/10; C07K15/12; C12N1/20; C12N15/00;
C12N15/38; C12P21/02; C12Q1/68; G01N33/569

- European: C12N15/10C15; A61K39/245; C07K14/05;
C12Q1/68M10; C12Q1/70B4; G01N33/569K

Application number: JP19880284820 19881110**Priority number(s):** IE19870003041 19871111**Also published as:**

 EP0316170 (A2)
 EP0316170 (A3)
 IE873041L (L)

Report a data error here

Abstract not available for JP2002399

Abstract of corresponding document: **EP0316170**

A method for identifying all of the antigens from a pathogenic organism such as Epstein-Barr Virus which are expressed in vivo comprises generating a gene bank using nucleic acid fragments which include all of the nucleic acid from a given organism and direct screening of said gene bank with serum from a subject with clinical symptoms caused by the pathogenic organism. The antigens identified can be used as a basis for various diagnostic assays and for preparing vaccines.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

平2-2399

⑬ Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 平成2年(1990)1月8日

C 12 Q 1/68
A 61 K 39/245
39/395

A 6807-4B
ADY 8829-4C
S 8829-4C※

審査請求 未請求 請求項の数 21 (全18頁)

⑮ 発明の名称 抗原の同定法、そのアッセイ法及びそれを含むワクチン

⑯ 特 願 昭63-284820

⑰ 出 願 昭63(1988)11月10日

優先権主張 ⑱ 1987年11月11日 ⑲ アイルランド(I E) ⑳ 3041/87

㉑ 発 明 者 バーナード フランシ アイルランド国 ガルウェイ、ソルト ヒル、ボールナロ
ス ザビアー ガンノ ーマ ウェスト, 12, “マーガン”
ン

㉒ 出 願 人 ジー ジーン ガルウ アイルランド国 ガルウェイ、ユニバーシティー カレツ
エイ リミテッド ジ ガルウェイ(番地なし)

㉓ 代 理 人 弁理士 浅 村 皓 外3名
最終頁に続く

明細書の浄書(内容に変更なし)

明 細 書

1. 発 明 の 名 称

抗原の同定法、そのアッセイ法及びそれを含む
ワクチン

2. 特 許 請 求 の 範 囲

(1) in vivo で発現される病原生物の抗原の全
てを同定する方法であつて、病原生物の全ての核
酸を含む核酸フラグメントを用いて遺伝子バンク
を作成し、次いで該病原生物によつて引き起こさ
れた臨床症状を有する対象から得た血清を用いて
該遺伝子バンクを直接スクリーニングすることか
らなる上記方法。

(2) in vivo で発現される抗原をコードする核
酸を得る方法であつて、該抗原をコードする配列
を含む病原生物の全核酸を核酸フラグメントに変
換し、該核酸フラグメントを発現ベクターに移し、
該核もしくは原核宿主生物を該発現ベクターで形
質転換し、次いで該宿主生物のコロニーを該病原
生物によつて引き起こされた臨床症状を有する対
象から得た血清でスクリーニングすることからな

る上記方法。

(3) 核酸サンプルにおいて反復して存在する領
域を同定する方法であつて、生物の核酸の全てを
含む核酸フラグメントを用いて遺伝子バンクを作
成し、該遺伝子バンクを相同性核酸のプロープで
スクリーニングし、次いで反復核酸領域の存在を
示す強くハイブリダイズするコロニーを同定する
ことからなる上記方法。

(4) in vivo で発現するEBV抗原をコードす
るDNAを得る方法であつて、EBV DNAを
フラグメントに変換し該フラグメントを発現ベク
ター中にクローニングし、該発現ベクターで微生
物を形質転換し、EBVで感染していることが知
られているヒトの血清で該微生物のコロニーをス
クリーニングし、次いでイムノポジティブクロー
ンを単離することからなる上記方法。

(5) 以下に示す配列から選ばれるin vivo
EBV抗原をコードするDNA配列:

(A)	GC TCT	TCC GGG	GCC AGG	GGG CAG	TGG AGG	CCC GTC	TGG GGC	GGT C	AAG 48;
(B)	GC CCA AGC CCT GTT	AGC GAC CGA CCT C	AGG CCG CCG CGG 105;	CTC GGT GCC GGC	ACC CTC GGC CAG	ACC GGC CGC CCG	ACA CAG CTG CGG	GGC CCG GGG TTG	CCC
(C)	C TGT TCG CCC CTC AAA GCC GAG	CGG CCT GGC GCC CCC ACC TC	GGT TCA ACC TCC TCC AAA CTC 174;	TGG GAG CCA AGG CCT GAA GGG GCC	TTC GAA CAG AGG CTG TGT GCC	TGC CCA CCC CGC AGC CTG CAG	CCC GGG CTC CCT CCC AGG GCC	TCT ACC GGG GGT GTT GGA CCA	CTC
(D)	GC AGG	CCG GGC	AGC 29;	CTC	TCC	CTC	GGG	GAG	
(E)	GG AGG AAA GGC ACG	CGC GCG AGC TTC CTC	CAA GCT GGG TAC AAG	CAG GCT GIG AGG GGA	GCC GAA CCG ACC GGA	TTT TGC GTC ATC GAG	CAG CAT GIG AAC GGC	ACC GCC GCC GCC C	
(F)	GT GCC CTG ATC	GCC ACA TTA CAG	GTG GAC CCA TGG	CTA CCC CAT GC	GAT ATT TCT 82;	ATT TTG AGG	TCA TCC TCC	ACT CAC TGC	
(G)	A GGG GCC	GTC GAG CAC	CAG CTC TAC	ACG TTC GTG	CTT CGC AGG	TTT TTC C	CGC ATC 62.	CAC TGG	

(1)	Ser Ser	Ser Gly	Ala Arg	Gly Gln	Trp Arg	Pro Val	Trp Gly;	Gly Lys
(2)	Pro Ser Pro Val;	Ser Asp Arg Pro	Arg Pro Arg	Leu Gly Ala Gly	Thr Leu Pro Gln	Thr Gly Arg Pro	Thr Gln Leu Pro	Gly Pro Ala Gly Leu
(3)	Cys Ser Pro Leu Lys Ala Glu;	Arg Pro Gly Ala Arg Pro Thr	Gly Ser Ser Pro Lys Leu	Trp Glu Pro Arg Gly	Phe Glu Pro Arg Ala	Cys Pro Pro Ser Leu Gln	Pro Gly Leu Pro Arg Ala	Ser Thr Gly Val Gly Pro Leu
(4)	Arg	Pro Gly;	Ser	Leu	Ser	Leu	Ala	Glu
(5)	Arg Ala Ser Phe Leu	Gln Ala Gly Tyr Lys	Gln Ala Val Arg Gly	Ala Glu Pro Thr Gly	Phe Cys Val Ile Glu	Gln His Val Asn Gly;	Thr Ala Ala Thr	Arg Lys Gly Thr
(6)	Ala Thr Leu Gln	Val Asp Pro Trp;	Leu Pro His	Asp Ile Ser	Ile Leu Arg	Ser Ser	Thr His Cys	Ala Leu Ile
(7)	Val Glu His	Gln Leu Tyr	Thr Phe Val	Leu Arg Arg.	Phe Phe	Arg Ile	His Trp	Gly Ala

(6) 請求項5記載のDNA配列を含む、DNA発現ベクター又は発現可能性を有するDNAトランスファベクター。

(7) マーカー遺伝子に融合した請求項5記載のDNA配列。

(8) 請求項6記載のベクターを保持する微生物。

(9) 請求項5記載のDNA配列によってコードされる抗原性EBVペプチドもしくは蛋白質。

(10) 以下のアミノ酸配列から選ばれるアミノ酸配列を含む、請求項9記載の抗原性EBVペプチドもしくは蛋白質：

(11) 請求項9又は10記載の抗原性EBVペプチドもしくは蛋白質を含むワクチン。

(12) 請求項9又は10記載のEBVペプチドもしくは蛋白質抗原に対して特異的な抗体調製物。

(13) EBVの検出及び測定法であつて、EBVに対する抗体を含むことが知られている又は疑われる血清を、請求項9又は10記載のEBVペプチドもしくは蛋白質抗原と接触せしめ、EBV抗原とEBVに対する抗体とで免疫化学的反応を起こさせ、次いでそれ自体公知の方法でEBVに対する抗体の存在量を測定することからなる上記方法。

(14) EBVに対する抗体の検出及び測定用免疫アッセイ法であつて、

(a) EBVに対する抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを、請求項9又は10記載のEBV抗原の不溶化型に加え、

(b) 免疫化学的反応を起こさせ、次いで

(c) ラベル化剤に共有結合した抗EBV抗体からなるラベル化抗体の一定量を加えて、サンプル

ル中に存在するEBV抗体の量の指標である反応メデイウムの活性を測定する；

ことからなる上記方法。

(15) EBVに対する抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a*) EBVに対する抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを、請求項9又は10記載のEBV抗原の不溶化型に加え、

(b*) 免疫化学的反応を起こさせ；次いで

(c*) 反応メデイウムに、不溶化型EBV抗原に結合したEBVに対する抗体に結合する抗ヒトイムノグロブリン抗体の一定量を加えて、結合抗ヒトイムノグロブリン抗体の量を測定し、それによつて結合EBV抗体の量を測定する；

ことからなる上記方法。

(16) EBV抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a') EBV抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを、蛋白質吸着物質の表面に加え；

(19) EBVに対する抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a'') β -ガラクトシダーゼに融合したEBV抗原のある量を、抗 β -ガラクトシダーゼ抗体の不溶化型に加えて、免疫化学的反応を起こさせ；

(b'') EBVに対する抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを加えて、免疫化学的反応を起こさせ；次いで

(c'') 抗ヒトイムノグロブリン抗体の一定量を加えて、免疫化学的反応を起こさせ、結合抗ヒトイムノグロブリン抗体の量を測定することによつてEBVに対する抗体の量を測定する；

ことからなる上記方法。

(20) ラベル化EBV抗体とともに体液サンプルを加えて競合結合イムノアッセイを行なつてEBV抗体の量を測定する工程を、工程(b''')及び(c''')に代わつて行なう請求項19記載の方法。

(21) 体液中のEBV抗体の検出及び測定用テストバツクであつて、

(b') ある量のEBV抗原を加えて免疫化学的反応を起こさせ；次いで

(c') ラベル化EBV抗体の一定量を加えて、結合EBV抗体の指標であるラベル活性を測定する；

ことからなる上記方法。

(17) EBV抗原の代わりに、レポーターエレメントに融合したEBV抗原のある量を加えて、EBV抗体の量をそれ自体公知の方法で測定する請求項16記載の方法。

(18) EBVに対するIgM抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a'') EBVに対するIgM抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを、抗ヒトIgM抗体の不溶化型に加え；

(b'') 免疫化学的反応を起こさせ；次いで

(c'') レポーターエレメントに融合したEBV抗原のある量を加えて、更に免疫化学的反応を起こさせる；

ことからなる上記方法。

(aa) 請求項9又は10記載の不溶化型EBV抗原の一定量；及び

(bb) 酵素あるいは放射性ラベル化剤と抗B抗体との結合生成物の対応量；

を含む上記テストバツク。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、*in vivo* で発現される抗原及びその診断薬並びにワクチンとしての用途に関する。更に詳細には、ウイルス抗原特にエプスタイン・バールウイルス(EBV)抗原及びその診断薬並びにワクチンとしての用途に関する。

精製した抗原を診断テスト用に使用することが益々重要になつて来ている。従来、抗原の精製は生化学方法を用いて精製を何度も繰返すことによつて行なわれている。他の方法として、組換えDNA技術を利用して単離した抗原をクローン化して宿主生物中で発現する方法が、今日では広く使用されるようになってきている。

エプスタイン・バールウイルスは、ほとんどの成人が感染しているヘルペスウイルスの1つであ

る。EBVは伝染性単核症(IM)を引き起こす病原体でもある。また、EBVはリウマチ性関節炎にも関係しており、バーキツリンパ腫、上咽頭癌などのB-リンパ腫の病原体でもある。しかしながらEBVは良性の効果も有しており、多くの人々は上記した病気にかかることなく、EBVの感染によつてEBVに対する抗体が陽性の血清を持つようになる。

in vitroでは、EBVはB-リンパ球の増殖を促進し、増殖状態あるいは潜伏状態で生存することができる。

EBV感染あるいはEBV再活性化の診断は、通常、異好性Paul-Bunnell-Davidson(Honospot)テストによつて行なわれており、このテストはEBV抗体と非関連ウマ蛋白質との偶発性交差反応を利用したものである。このテストは迅速にかつ安価に行なうことができるが、その原理からまたその有効性がわずかに80%程度であることから、このテストはラフな診断法として使用できるにすぎない。またこのテストは、EBV感染は異なつ

てフェーズを有しその進行性も異常なため、100%有効とは言えないものである。従つて、より確實で有効なテスト法の開発が必要である。より確實で有効なテストとしてスライドテストがあり、この方法はEBV形質転換細胞、テスト血清及び蛍光ラベル化第2抗体を使用するものである。このテストでは、EBV抗原を放出する形質転換細胞が溶解される。このスライドテストは理にかなつており安価に実施することができるが、熟練を要し、EBV形質転換細胞が増殖するという危険性を有するものでもある。

従つて、真正なEBV抗原を用いた診断法の開発が必要である。

エプスタイン-バー核抗原(EBNA)、ウイルスカプシド抗原(VCA)及び他の初期EBV抗原などの多数のEBV抗原が今日では知られている。

EBVのB95-8株の全DNA配列が決定されており[Baer, R., et al., (1984) Nature 310, 207-211]、これによつて

分子生物学の研究が大いに促進されている。

EBVの分子組織の分析が進んでおり、この分析研究は内部反復配列を含む領域について益々精力的に行なわれている(第1図のBamHI Wフラグメント参照)[Cheung, A.とKieff, E. (1982) J. Virol., 44, 286-294; Jones, M. D.とGriffin, E. B. (1983) Nucleic Acid Res., 11, 3913-3936]。今日までに行なわれているこれらの分析は次のようなものである。

(i) ゲノムEBV DNAフラグメントを用いたトランスフェクションの研究であり、これにより、EBV核抗原2(EBNA2)産生を誘導するためにはBamHI Wフラグメントのインタクトコピーが必要であることが明らかにされた[Rymo, L. et al., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 82, 3435-3439; Huebner-Lantzsch, M., et al., (1985) EMBO J., 4, 1805-1811];

(ii) 増殖性の、あるいは非増殖性の感染細胞

から得たウイルス転写体の分析研究であり、これにより、BamHI Wフラグメントに相同性を有する配列が該転写体に含まれていることが示された[King W. et al., (1980), J. Virol., 36, 806-818; Hummel H. とKieff, E. (1982) J. Virol., 43, 262-272; Shin, S. et al., (1983) Virology, 124, 13-20];

(iii) スプライシングを受けた転写体に対応するcDNAの配列決定と分析研究であり、これにより、BamHI Wからのコモンエクソンを有するcDNAクローンのファミリーが同定された[Bodescot, H. et al., (1984) EMBO J., 3, 1913-1917; Bodescot, H. et al., (1986) Nucleic Acids Res., 14, 2611-2620; Speck, S. とStrominger, J. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 82, 8305-8309; Speck, S. H. et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 9298-9302; Sample J.

et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 83, 5096-5100);

(iv) 反復コード化エクソンの予想アミノ酸配列から推定されるペプチドを合成しこれを用いる研究により、それらのいくつかに対する抗体はEBV発現蛋白質と反応することが示された [Dilliner, J. et. al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 83, 6641-6645]。

本発明の目的は、in vivo で発現される病原生物の抗原の全てを同定することを可能にする方法及び該抗原の診断薬並びにワクチンとしての用途を提供することにある。

本発明の他の目的は、真正なEBV抗原に基づいたEBVのアッセイ法であつて公知のEBV測定法及び検出法に比べて感度が良くその測定範囲の広いアッセイ法を提供することにある。

しかし、本発明により、in vivo で発現される病原生物の抗原の全てを同定する方法であつて、病原生物の全ての核酸を含む核酸フラグメントを

用いて遺伝子バンクを作成し、該病原生物によつて引き起こされた臨床症状を有する対象から得た血清を用いて該遺伝子バンクを直接スクリーニングすることからなる上記方法が提供される。

核酸フラグメントは、終止コドンをつけるために、1 kb以下の平均の大きさを有するフラグメントが好ましい。このような方法においては、病原生物の核酸を含む配列は全て、発現される機会を有しており、適当な抗原あるいは求める抗体については推定によつて決定されるということはない。

また本発明によれば、in vivo で発現される抗原をコードする核酸を得る方法であつて、該抗原をコードする配列を含む病原生物の全核酸を核酸フラグメントに変換し、該核酸フラグメントを発現ベクターに移し、真核もしくは原核宿主生物を該発現ベクターで形質転換し、該宿主生物のコロニーを該病原生物によつて引き起こされた臨床症状を有する対象から得た血清でスクリーニングすることからなる上記方法が提供される。

ここで使用される核酸はDNAが好ましい。

病原生物の全核酸は、1つまたはそれ以上の制限酵素を用いてフラグメントに変換される。しかしながら、各種のヌクレアーゼを用いることもでき、また1つもしくはそれ以上のヌクレアーゼとポリメラーゼを組合わせて用いることもできる。この組合わせを用いることにより、発現ベクターに連結する前にフラグメントを平滑末端にすることができる。超音波処理又は他の物理的手段を用いても、全核酸を核酸フラグメントに変換することができる。

病原生物は、バクテリア、昆虫、ウイルス、酵母、あるいはこれら以外のパラサイトでもよい。好ましくは病原生物はウイルスである。

以下に、エプスタインバーウイルスをモデルとして本発明を説明する。

本発明によつてスクリーニングする血清の対象はヒトでもヒト以外の動物でもよい。

本発明の方法を用いて、公知の蛋白質コード領域を有する遺伝子の抗原性領域を同定することもできる。

いずれの病原生物も免疫応答を引き起こす。しかし、本発明の方法により、必ず存在する抗原を同定することができる。従つて、本発明の方法により、未だ知られていない分子生物学分野におけるウイルス又は他の抗原を単離することもできる。病原抗原をコードする核酸配列はいずれも、in vivo で発現される可能性を持つている。組換えDNA技術を用いて抗原を宿主生物で発現するこれまでの実験ではほとんどの場合、抗原をコードする核酸配列の分子生物学的知識は知られていることが必要であつた。

本発明による上記した方法は、ある遺伝子が抗原をコードすることが知られているような場合には抗原性領域の正確な配列を規定するのに用いることができる。

また本発明によれば、以下に定義するEBV抗原をコードするDNAを得る方法であつて、EBV DNAをフラグメントに変換し該フラグメントを発現ベクター中にクローニングし、該発現ベクターで微生物を形質転換し、EBVで感染

していることが知られているヒトの血清で該微生物のコロニーをスクリーニングし、次いでイムノポジティブクローンを単離することからなる方法が提供される。

EBV DNAをフラグメントに変換するためには、制限酵素で消化するのが好ましい。

本発明の方法は、遺伝子中の反復配列を同定するのに用いることができる。

本発明の更に他の局面によれば、核酸サンプルにおいて反復して存在する領域を同定する方法であつて、生物の核酸の全てを含む核酸フラグメントを用いて遺伝子バンクを作成し、該遺伝子バンクを相同性核酸のプロープでスクリーニングし、反復核酸領域の存在を示す強くハイブリダイズするコロニーを同定することからなる上記方法が提供される。

本発明により、in vivo でEBV抗原をコードするDNA配列であつて、以下の配列から選ばれるDNA配列が提供される。

配列(A)-(D)はEBVのBamHI Wフラグメントの1部であり、配列(E)、(F)、(G)はそれぞれEBVのBamHI N、BamHI F、BamHI Vフラグメントの1部である。

EBV BamHI WフラグメントについてはJones, H. D. & Griffin, B. E. (1983) (Nucleic Acids Res., 11, 3913-3936)のナンバリング系を用い、他のEBV BamHIフラグメントについてはBaer, R., et al. (前記の通)のナンバリング系を用いて、上記したDNA配列についてヌクレオチド番号を示すと以下の通りである。

DNA配列	ヌクレオチド番号
A	2373-2421
B	2566-2671
C	2858-2832
D	2998-3027
E	2712-2831
F	55593-55674
G	146694-146755

(A)	GC TCC GCC GGG TGG CCC TGG GGT AAG TCT GGG AGG CAG AGC GTC GGC C 48;
(B)	GC AGC AGG CTC ACC ACC ACA GGC CCC CCA GAC CCG GGT CTC GCG CAG CCG AGC CGA CCG GCG CCG CCG CTG GCG CCT CCT CCG GGC CAG CCG CCG GGG TTG GTT C 105;
(C)	C CGG GGT TGG TTC TGC CCC TCT CTC TGT CCT TCA GAG GAA CCA GGG ACC TCG GGC ACC CCA GAG CCC CTC GGG CCC GCC TCC AGG CCG CCT CCT GGT CTC CGC TCC CCT CTG AGC CCC GTT AAA CCC AAA GAA TGT CTG AGG GGA GCC ACC CTC GGG GCC CAG GCC CCA GAG TC 174;
(D)	GC CCG AGC CTC TCC CTC GCG GAG AGG GGC 29;
(E)	GG CGC CAA CAG GCC TTT CAG ACC AGG GCG GCG GCT GAA TGC CAT GCC AAA AGC GGG GTG CCG GTC GTG GCC GGC TTC TAC AGG ACC ATC AAC GCC ACG CTC AAG GGA GGA GAG GGC C 117;
(F)	GT GCC GTG CTA GAT ATT TCA ACT GCC ACA GAC CCC ATT TTG TCC CAC CTG TTA CCA CAT TCT AGG TCC TGC ATC CAG TGG GC 82;
(G)	A GTC CAG ACG CTT TTC GGC CAC GGG GAG CTC TTC CCG TTC ATC TGG GCC CAC TAC GTG AGG C 62.

DNA配列(B)と(C)との間の13bp重複配列は下線で示した。

また本発明によれば、配列(A)-(G)に対応するオープンリーディングフレームを含むDNA配列が提供される。

また本発明によれば、上記したDNA配列(A)-(G)いずれかから選ばれるDNA配列を含むDNA発現ベクターが提供される。また本発明によれば、発現可能性を有するDNAトランスファクターであつて、上記したDNA配列(A)-(G)のいずれかから選ばれるDNA配列を含む該DNAトランスファクターが提供される。発現ベクターはプラスミドが好ましく、より具体的にはオープンリーディングフレームプラスミドpORF1(Weinstock, G. M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 80, 4432-4436)である。該発現ベクターは微生物中に導入して複製することができる。

更に本発明によれば、マーカー遺伝子に融合した上記のDNA配列(A)-(G)のいずれかから選ば

れたDNA配列が提供される。該マーカー遺伝子は、プラスミドpORF1のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子が好ましい。

しかして本発明によれば、上記したDNA配列(A)-(G)のいずれかから選ばれるDNA配列を含む発現ベクターを保持する微生物が提供される。特に好適な微生物は、*E. coli*などのバクテリアであり、より具体的には、*lac*欠損株 *E. coli* MH3000: *ara* D139Δ(*ara*, *leu*) 7697Δ(*lac*) × 74 gal U gal K *rps* (*str*^r) omp R101 (Weinstock, G. H., et al., supra) である。

また本発明によれば、上記したDNA配列(A)-(G)のいずれかから選ばれるDNA配列によってコードされる抗原性EBVペプチド/蛋白質が提供される。特に本発明によれば、上記したDNA配列(A)-(G)のいずれかによってコードされ、以下に示すアミノ酸配列から選ばれる抗原性EBVペプチド/蛋白質が提供される：

- | | | | | | | | | | |
|-----|--|---|---|---|---|---|---|---|-------------------|
| (1) | Ser | Ser
Gly | Ala
Arg | Gly
Gln | Trp
Arg | Pro
Val | Trp
Gly; | Gly | Lys |
| (2) | Pro
Ser
Pro
Val; | Ser
Asp
Arg
Pro | Arg
Pro
Pro
Arg | Leu
Gly
Ala
Gly | Thr
Leu
Pro
Gln | Thr
Gly
Arg
Pro | Thr
Gln
Leu
Pro | Gly
Pro
Ala
Gly | Pro
Leu
Leu |
| (3) | Cys
Ser
Pro
Leu
Lys
Ala
Glu; | Arg
Pro
Gly
Ala
Arg
Pro
Thr | Gly
Ser
Thr
Ser
Ser
Lys
Leu | Trp
Glu
Pro
Glu
Arg
Pro
Gly | Phe
Glu
Glu
Arg
Leu
Cys
Ala | Cys
Pro
Pro
Pro
Ser
Leu
Gln | Pro
Gly
Leu
Pro
Pro
Arg
Ala | Ser
Thr
Gly
Pro
Val
Gly
Pro | Leu |
| (4) | Arg | Pro
Gly; | Ser | Leu | Ser | Leu | Ala | Glu | |
| (5) | Arg
Ala
Ser
Phe
Leu | Gln
Ala
Gly
Tyr
Lys | Gln
Ala
Val
Arg
Gly | Ala
Glu
Pro
Thr
Gly | Phe
Cys
Val
Ile
Glu | Gln
His
Val
Asn
Gly; | Thr
Ala
Ala
Ala | Arg
Lys
Gly
Thr | |
| (6) | Ala
Thr
Leu
Gln | Val
Asp
Pro
Trp; | Leu
Pro
His | Asp
Ile
Ser | Ile
Leu
Arg | Ser
Ser
Ser | Thr
His
Cys | Ala
Leu
Ile | |
| (7) | Val
Glu
His | Gln
Leu
Tyr | Thr
Phe
Val | Leu
Arg
Arg. | Phe
Phe
Ile | Arg
Ile | His
Trp | Gly
Ala | |

ペプチドをコードする遺伝子のヌクレオチド配列が明らかになれば、そのペプチドは化学的に合成することができる。

また本発明によれば、その塩基配列の翻訳領域がマーカー蛋白質と任意に結合していてもよい上記したEBVペプチド/蛋白質をコードする塩基配列を含む、上記したヌクレオチド配列(A)-(G)またはその等価物の1部もしくは全部を有するDNAを含む組換えDNA発現ベクターが提供される。該マーカー蛋白質はβ-ガラクトシダーゼ酵素が好適である。

また本発明によれば、上記に定義した抗原性EBVペプチド/蛋白質を含むワクチンが提供される。

また本発明によれば、上記したEBVペプチドもしくは蛋白質抗原に対して特異的な抗体調製物が提供される。

in vivo で発現される抗原に対する抗体のレベルは患者によって変動し得るものである。抗原の存在に加えて、抗原量も診断対象の値である。更

には、抗原に対する血清中に存在する抗体のクラス(IgM、IgA、IgG)も、診断用のインディケーターとして有用である。

また本発明によれば、EBVの検出及び測定法であつて、EBVに対する抗体を含むことが知られている又は疑われる血清を上記した抗原と接触せしめ、EBV抗原とEBVに対する抗体との免疫化学的反応を起こさせ、次いでそれ自体公知の方法でEBVに対する抗体の存在量を測定することからなる上記方法が提供される。EBVに対する抗体は、酵素的に、免疫学的にあるいは放射活性測定により測定することができる。

本発明のEBV抗原は特異的EBV抗体を得る及び単離する手段として使用することができ、またこのEBV抗体は、対応するEBV抗原の検出及び測定用イムノアッセイに用いることの出来るEBVに対する抗体の不溶化型を作成することにより使用することができる。

更に本発明によれば、EBVに対する抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a) EBVに対する抗体を含んでいる又は含んでいることが疑われる体液サンプルを、上記に定量化したEBV抗原の不溶化型に加え；

(b) 免疫化学反応を起こさせ；次いで

(c) ラベル化剤に共有結合した抗EBV抗体からなるラベル化抗体の一定量を加えて、サンプル中に存在するEBV抗体の量の指標である反応メデイウムの活性を測定する；

ことからなる上記方法が提供される。

好ましくは、ラベル化抗体は、酵素又は放射性ラベル化剤に共有結合した抗EBV抗体からなるものであり、反応メデイウムの酵素活性又は放射活性は慣用的方法によつて測定できる。上記した変法として、体液サンプルとともにラベル化EBV抗体を同時に加え、次いでEBVに対する抗体を測定する競合結合イムノアッセイ法があり、該方法によつて測定することもできる。

上記した方法における工程(c)は、他の工程によつて行なうこともできる。即ち、反応メデイウムに、不溶化型EBV抗原が結合したEBVに對

する抗体に更に抗ヒトイムノグロブリン抗体が結合したものの一定量を加え、次いで結合抗ヒトイムノグロブリン抗体量即ち結合EBV抗体量を測定する工程によつて行なつてもよい。抗ヒトイムノグロブリン抗体は抗IgM、抗IgA、抗IgGのいずれでもよい。

EBV抗原は、蛋白質吸着用物質の表面上に直接又は間接的にコートされているのが好ましい。かかる蛋白質吸着用物質としては、例えば、プラスチック製マイクロタイトレーションプレートもしくはストリップ、ラテックスビーズ、“デツプステイック”デバイスなどが挙げられる。好適なマイクロタイトレーションプレートとしては、トレードマーク・MICROELISAでDYNATECHから販売されているフラットウエルポリスチレンマイクロタイトレーションプレート、トレードマーク・HUNG：INHULONで販売されているプレートなどのガンマ照射マイクロタイトレーションプレートが挙げられる。好適なマイクロタイトレーションストリップとしては、トレードマーク・RENOVANELLで

DYNATECHより販売されているものが挙げられる。蛋白質吸着用物質の表面にEBV抗原を間接的にコートするためには、該表面に先ずEBV抗体を加えて結合せしめ次いで結合したEBV抗体にEBV抗原を加えることによつて行なうことができる。

しかしながら、本発明のEBV抗原は各種のイムノアッセイ法に用いることができる。

しかし、本発明によれば、EBV抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a') EBV抗体を含んでいる又は含んでいることが疑われる体液サンプルを、上記した蛋白質吸着用物質の表面に加え；

(b') EBV抗原のある量を加えて免疫化学反応を起こさせ；次いで

(c') ラベル化EBV抗体の一定量を加えて、結合EBV抗体の指標であるラベル活性を測定する；

ことからなる上記方法が提供される。

上記の工程(b')においては、EBV抗原の代

わりに、β-ガラクトシダーゼ又は他の酵素などのレポーターエレメントに融合したEBV抗原の一定量を加えることもできる。EBV抗体の量は通常の方法によつて測定することができる。即ち、例えばβ-ガラクトシダーゼを用いた場合には、β-ガラクトシダーゼが融合した結合EBV抗体のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定することによつて行なうことができる。このアッセイ法は、用いるレポーターエレメントによつて、常法により修正することができる。

β-ガラクトシダーゼ活性を直接測定する代わりに、ラベル化抗β-ガラクトシダーゼ抗体を、β-ガラクトシダーゼに融合した結合EBV抗原に加え、次いでEBVに対する抗体の指標としてラベル活性を測定することもできる。好ましいラベル化抗β-ガラクトシダーゼ抗体は、ホースラディッシュパーオキシダーゼなどのラベル酵素に共有結合した抗β-ガラクトシダーゼ抗体からなるラベル化抗β-ガラクトシダーゼ抗体である。他のレポーターエレメントに対するラベル化抗体を

使用することもできる。

また本発明によれば、EBVに対する抗体の各種のクラスを測定する方法が提供される。本発明によれば、例えば、EBVに対するIgM抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a") EBVに対するIgM抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを、抗ヒト

IgM抗体の不溶化型に加え；

(b") 免疫化学的反応を起こさせ；次いで

(c") レポーターエレメントに融合したEBV抗原のある量を加えて、更に免疫化学的反応を起こさせる；

ことからなる上記方法が提供される。

レポーターエレメントはβ-ガラクトシダーゼが好ましい。

EBVに対するIgM抗体の量は、β-ガラクトシダーゼあるいは他のレポーターエレメントに融合した結合EBV抗原のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定することにより、又はラベル化抗β-ガラクトシダーゼ抗体あるいは上記した他のレポ

ーターエレメントに対する抗体の量を測定することによりEBVに対する抗体の量を測定する；

ことからなる上記方法が提供される。

上記した方法の場合においても、β-ガラクトシダーゼの代わりに他のレポーターエレメントを用いることができる。

上記の工程(b")および(c")は、他の方法によつて行なうこともできる。即ち、ラベル化したEBVに対する抗体と一緒に体液サンプリングを加えて競合結合イムノアッセイを行ない、EBVに対する抗体の量を測定することによつて行なうこともできる。

サンプルとしては血清サンプルが好ましい。

また本発明によれば、体液中のEBVに対する抗体を検出及び測定するためのテストバツクであつて、

(aa) 上記した不溶化型EBV抗原の一定量；及び

(bb) 酵素あるいは放射性ラベル化剤と抗

ーターエレメントに対するラベル化抗体を用いて測定することができる。上記工程(c")の他の方法として、β-ガラクトシダーゼに融合したEBV抗原の代わりにEBV抗原の一定量を加える方法を採用してもよい。EBVに対するIgM抗体の量は、上記したように、ラベル化EBV抗体を加えることによつて測定できる。

上記した方法は、EBV抗原に対するIgA抗体などの他のクラスの抗体の測定に用いることもできる。

また本発明によれば、EBVに対する抗体の検出及び測定用イムノアッセイ法であつて、

(a") β-ガラクトシダーゼに融合したEBV抗原のある量を、抗β-ガラクトシダーゼ抗体の不溶化型に加えて、免疫化学的反応を起こさせ；

(b") EBVに対する抗体を含む又は含むことが疑われる体液サンプルを加えて、免疫化学的反応を起こさせ；次いで

(c") 抗ヒトイムノグロブリン抗体の一定量

EBV抗体との結合生成物の対応量；

を含む上記テストバツクが提供される。テストバツクに、酵素と抗EBV抗体との結合生成物が用いられる場合には、該テストバツクには酵素活性測定用基質が含まれる。

放射性ラベル化剤は¹²⁵Iが好ましい。

しかしながら、上記の本発明によるイムノアッセイを実施するために必要な成分であれば、上記のテストバツクはいずれの成分を含んでいてもよい。

以下に図面について説明する。

第1A図はEBV B95-8ゲノムを直線的に示したものである。TR及びIRで命名されるタンデムに反復する一群の配列は、US及びUL領域の境界を示すものである。

第1B図はEBV B95-8ウイルスゲノムのBamHI制限酵素地図を直線的に示したものである。

第2図は、本発明で調製される抗原コード配列を含むクローン化EBV DNAフラグメントが

SmaI部位に挿入された発現ベクターpORF1を示す。

第3図は、本発明によつて調製されるEBV B95-8ゲノムバンクを抗EBVヒト血清でスクリーニングして単離されたイムノポジティブクローンを示す。

第4図は、第3図で示したイムノポジティブクローンをClaIで消化後に選択されるプラスミドDNAを示す。

第5図は、EBV B95-8のBamHIフラグメントの³²P-ラベル化803bp PvuIIサブフラグメントでプローブされる第4図のプラスミドDNAのサザンブロット分析のオートラジオグラフィーを示す。

第6図は、EBV B95-8 BamHI Wフラグメントのシングルコピーを示し、更に、転写及び/又は発現されることが知られた配列の相対的位置及びリーディングフレームを表わす。クローンA-D (CLA, CLB, CLC, CLD) で示される薄い黒いバーは、本発明によるEBV

抗原をコードする発現DNA配列(A)-(D)を表わす。

第7図は、EBV B95-8ゲノムを示し、本発明によるEBV抗原をコードするDNA配列(A)-(D)の相対的位置を表わす。

以下の実施例により本発明を更に詳細に説明する。

実施例1

EBV抗原発現クローンの単離

University Research Institute for Biomedicine (フロリダ、U. S. A) 及び Microbiological Associates Inc. (ベテスタ、メリーランド、U. S. A) から、EBV B95-8 DNAを購入した。このDNAは部分的分解が行なわれており平均1 kb以下の大きさのフラグメントである。このDNAをS1ヌクレアーゼ及びT4 DNAポリメラーゼを用いて平滑末端とし、オープンリーディングフレーム発現ベクターpORF1 (第2図) [Weinstock et al., (1983) supra] のユニーク SmaI 部位へ連

結した。このpORF1は次の特徴点を有している。即ち、(i) 非活性のβ-ガラクトシダーゼ遺伝子を含んでいる；(ii) β-ガラクトシダーゼ遺伝子のN-末端にポリリンカークローニング部位を有している；(iii) この部位に挿入されたORF DNAは、E. coliプロモーター及びイニシエーター配列ompFのコントロール下で発現される。この挿入により翻訳フェーズに適当な変化が生じ、このためβ-ガラクトシダーゼが融合蛋白質として発現されるようになる。

EBV DNAを保持する発現ベクターで上記したlac欠損株 E. coli MH3000を形質転換した。発現ベクターpORF1と E. coli MH3000は、G. H. Weinstock から贈られた。配列(G)は E. coli株 J. M. 105でも機能を有していた。

EBV DNAを含むプラスミドを保持した E. coliサンプル、pEBV-A、pEBV-B、pEBV-C、pEBV-D、pEBV-E、pEBV-F及びpEBV-Gを、National

Collection of Industrial and Marine

Bacteria Limited (NCIMB) に1988年10月24日に寄託し、受託番号NCIB40075、NCIB40076、NCIB40077、NCIB40078、NCIB40079、NCIB40080、NCIB40081がそれぞれ付されている。

プラスミドDNAは、標準CsCl/エチジウムプロミド遠心法 [Maniatis, T. et al., (1982) Molecular Cloning, a Laboratory Manual - Cold Spring Harbour, Cold Spring Harbour, New York] により調製した。プラスミドDNAは、アルカリ溶解法 [Birnboim, H. C. とDoly, J. (1979) Nucleic Acids Res. 7, 1513-1523] を用いてミニ溶解物から調製することもできる。

形質転換は、Dagert, H とEhrlich, S. D. (1979) Gene 6, 23に記載された方法に従って行なつた。形質転換体は、アミピシリンと5-ブromo-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガ

ラクトビラノシドを含む培地にプレートした。

60,000個の組換え体からなるジーンバンクについて、IM患者から得た血清を用いてEBV抗原の発現能を調べた。この血清は、Regional Hospital, Galway, Irelandで伝染性単核症と診断された患者から採取した。ジーンバンクについてはNucleic Acid Res. 16、7 (Walls, D. et al., 1988)にも記載されている。

12-O-テトラデカノイルホルボール-13-アセテートで誘導されたP3HR-1細胞、Raji細胞をそれぞれ含むスライド上で、間接蛍光抗体法 [Henle, W. と Henle, G. (1966) J. Bacteriol., 91、1248-1256] により、EBAのウイルスカプシッド抗原 (VCA)、初期抗原 (EA) に対する抗体レベルを測定して診断した。EBV核抗原 (EBNA) に対する抗体価は、Raji細胞を用いてACIF [Reedman, B. H. と Klein, G. (1973) Int. J. Cancer, 11、499-520] により測定した。EAに対する抗体の力価は定量せず、+又は-でスコア

ー付けを行なった所、ほとんどの血清は+であった。

E. coli蛋白質と交差反応する抗体があるために生じる初期のバツクグラントをなくするために血清の前処理が必要であった。E. coli蛋白質が結合したアフィニティークロマトグラフィーに血清を通して前処理を行なうことにより、このような交差反応性蛋白質を除去した。このスクリーニング工程によつて単離された陽性クローンは、第3図に示した。

Young, R. A. と Davies, R. W. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 80、1194-1196に記載された方法に、Walls, D. et al., (1988) (Nucleic Acids Res. 16、7)の方法を加味して若干変更し以下に示すようにして、ニトロセルロースフィルター上でin situでスクリーニングすべきコロニーを溶解した。

方法：

以下に示す各種のバッファーを調製した。

バッファーA1：0.17M NaCl
0.01M Tris-HCl (pH8.0)
0.1mM PMSF (フェニルメタンスルホニルフルオリド)
1.0mM KI。

バッファーA2：バッファーA1 + 0.01% SDS (ナトリウムドデシルスルフェート)。

バッファーA3：バッファーA1 + 3% BSA (ウシ血清アルブミン) (又はミルク蛋白質 (CadburyのHarvel: Harvelはトレードマーク)) + 0.1% ナトリウムアジド。
(実験を行なう日に調製した)。

バッファーB1：バッファーA1 + 0.1% Triton (Tritonはトレードマーク) × 100、
1mM EDTA。

バッファーB2：バッファーB1 + 0.1% SDS。

バッファーB3：バッファーB1 + 3% BSA (又は5% Harvel) + 0.1% ナトリウムアジド。
(実験を行なう日に調製した)。

血清の処理：

宿主細胞 (1.5 ml) を一晚培養し (以下工程 (1) 参照)、6,000 rpm で5分間遠心した。上清を除去し、ペレットをPBS (リン酸緩衝食塩水: 1タブレット/100 ml H₂O) (100 μl) に再懸濁した。PBS (90 μl) を血清サンプル (10 μl) に加え、かくして得られる血清を再懸濁した宿主細胞 (100 μl) に加え、室温で30-45分間放置した。次いでサンプルを8,000 rpm で5分間遠心した。得られた上清は、B3バッファーを含むフィルターに加えるのに用いた (以下工程 (9) 参照)。

次いで以下の方法に従つて、4日間経過後、ヒト抗EBV血清を用いて発現バンクについて免

疫学的スクリーニングを実施した。

第1日

(1) コロニーを適当な選択培地で37℃で一晩生育せしめた。コロニーのレプリカコピーを他のプレート上に置いた。

第2日

(2) ニトロセルロースフィルターをコロニーを含むプレート上に置き、5分間放置した。得られるニトロセルロースフィルターコロニーを、ベトリ皿のバッファ-A1とライソザイム(2mg/ml)に浸した82mm Whatman541フィルター上に置いた。クロロホルムに浸したWhatman541フィルターをベトリ皿のフタの中に置き、フタを閉じて30分間室温でインキュベートし、クロンを溶解した。

(3) 次いでフィルターを取り、コロニー側を上にして、バッファ-A2(7ml)を含む新しい皿に1時間浸した。この工程及びこれに続く全ての工程は室温で実施した。

(4) フィルターを取り、コロニー側を上にし

(10) フィルターをバッファ-B1(7mlで10分間)で洗浄した。

(11) 工程(10)をくり返した。

(12) フィルターをバッファ-B3(7ml)で15分間洗浄した。

(13) フィルターを、 125 I 蛋白質A (Sigma) (約 2×10^6 cpm / フィルター: バッファ-B3で希釈)とともに1晩インキュベートした。

第4日

(14) 工程(9)をくり返した。

(15) フィルターをバッファ-B1(7ml)で15分間洗浄した。

(16) 工程(15)を更に15分間くり返した。

(17) フィルターを乾燥し、-70℃で12-48時間増感スクリーンでオートラジオグラフィに付し、結合抗体を検出した。

実施例2

BamHI-WでコードされるEBV抗原を発現するクローンの固定

抗原発現が陽性である、即ち血清中に存在する

て、バッファ-A1(7ml)中で10分間リンスした。

(5) フィルターを取り、DNAse(2μg/ml)を含むバッファ-A1(7ml)中で前記と同様にしてインキュベートした。

(6) フィルターを取り、バッファ-A1(7ml)中で10分間リンスした。次いでフィルターをガラスベトリ皿に移した。ガラスベトリ皿は以下の全ての工程で用いた。

(7) フィルターをバッファ-A3(7ml/フィルター)中で1時間インキュベートした。この工程中は、上記した血清処理を実施した。

(8) 血清(前記の血清の処理で得た上清)をバッファ-B3(7ml)中に希釈し、この中でフィルターをインキュベートした。次いでフィルターをゆつくりと脱着しながら一晩インキュベートした。

第3日

(9) 血清を含むバッファを除き、フィルターをバッファ-B2(7ml)で10分間洗浄した。

抗体に対応する抗原を有するコロニーとして選択され精製されたコロニーのEBV DNAの配列決定を行ない、EBV遺伝子マップ上でのオープンリーディングフレームの位置を固定した。

BamHI-W領域のプロンプを調製するために、商業的に入手し得るインタクトEBV B95-8 DNAをBamHIで消化しpORF1にクローン化した。このバンクを、分解した全EBV DNAをプロンプとしてスクリーニングした。スクリーニングすべきコロニーを、製造業者の指針に基づき、82mmニトロセルロースフィルター(SchleicherとSchuell)に移し、製造業者の指針に基づくハイブリダイゼーションプロトコールでハイブリダイゼーションを行なった。消化したプラスミドのサザンブロット分析は、0.4M NaOHをトランスファーバッファとして用いてHybond N(トレードマーク、Amersham)上で行なった。DNAプロンプはオリゴラベル化法[Feinberg, A. P. とVogelstein, B. (1983) Analytical Biochem., 132, 6

-13] によつて作成した。強くハイブリダイズするコロニーを分析用に採取した。そのほとんどは、EBV BamHI Wコピーを有する pORF1組換えDNAを保持していることが、その大きさ及び以下の結果から判つた、Wの803bpPvuII-BamHIサブフラグメント(第6図)を単離し、放射標識化して、イムノポジティブクローンから得たプラスミドDNA調製物のClaI消化物を探索するのに用いた。その結果は第4及び第5図に示した。3個のイムノポジティブクローンのプラスミドDNAについて、ポジティブハイブリダイゼーションが観察された。特に第4図に示すように、クローン化ウイルスDNAフラグメントは1.3kbベクター配列に結合しており、そのフラグメントの大きさが増していることがその存在を示している。レーン1はpORF1を含み、レーン2-9はイムノポジティブクローンのpORF1組換えDNAを含む。レーンMはλサイズマーカー(HindIII消化)を含み、レーンWは精製EBV B95-8

置を決定した。すべての配列は、発現ベクター中での翻訳方向と同じ方向を有するオープンリーディングフレームの1部であつた。しかしながら、1つのコピー上で一緒にアラインメントを行なつた所、これらの配列は、13bpの重複DNAを含むフラグメントを2個有する3つの異なるオープンリーディングフレームの1部であることが判つた(第6図)。これらの領域からすでに同定されているDNA配列の位置及び特徴付けが行なわれているcDNA[Bodescot, H. et al., (1984) supra; Bodescot, H. et al., (1986) supra; Speck, S. et al., (1986) supra; Sample, J. et al., (1986) supra]並びに抗原をコードする配列は第6図に示されている。そして注目すべきことは、本発明によつて明らかにされたDNA配列は、これらの遺伝子の1部として知られていなかったことである。

第6図に示すように、第1、第2及び第3フレームは、第1図のスタンダードマップで左から右へ示した3つの可能なリーディングフレームを表

BamHI Wを含む。第5図は、BamHI Wの³²P-ラベル化803bpPvuIIサブフラグメントでプローブした第4図のゲルのサザンロットのオートラジオグラフを示す。三つのクローン、CLA、CLB及びCLC並びにBamHI W自身に、ポジティブハイブリダイゼーションが観察された。

実施例3

BamHI W抗原発現フラグメントのDNA配列分析

pORF1への挿入体をBamHIフラグメントとしてベクターM13mp10(Amersham)にサブクローン化し、ジデオキシ法によつて配列分析を行なつた。DNA配列データを、Microgenie(トレードマーク)ソフトウェアパッケージ及びGenbank(トレードマーク)データベースを用いて分析した。これらのデータから得られる配列を公知のEBV B95-8配列[Baer et al., (1984) supra]と比較することによつて、BamHI Wにおけるそれらの配列の正確な位

わしている。薄い垂直な線は終止コドンの位置を示している。前記したように、薄い黒い水平の線は公知の配列を示している。これらには、本発明によるDNA配列(A)-(D)が含まれており、また抗原を有する他の配列[Dillner, J., et al., (1986) Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A., (83, 6641-6645)]も含まれている。白い水平のバーで表わされる配列は抗原をコードしないものと推定されているものである[Dillner, J. et al., (1985) EMBO J., 4, 1813-1818; Dillner, J., et al., (1986) supra]。W1とW2はcDNAのラージファミリーに存在するエクソンを示す[Bodescot, H., et al., (1984) supra; Speck, S. とStroninger, J. (1985) supra; Sample J., et al., (1986) supra]。第6図のベースラインは、実施例2でクローンCLA-CLDのプローブとして用いたBamHI Wの803bpサブフラグメント(塩基数2269-3072)を作成するのに使用し

たPvuII部位の位置を示す。このプローブは、前記したエクソンW1とW2の配列を含まないものである。

上記実施例で用いた方法は、EMBO Journal 7, 4, pp1191-1196 (1988)に記載されている。

本発明に関連して、BamHI-W反復領域のEBV ORF、及びin vivoで抗原性ペプチド/蛋白質をコードするEBVの領域を同定することを本発明者は試みた。このアプローチは、全EBV DNAのランダムフラグメントを用いてこれを発現ベクターにサブクローンし、得られるジーンバンクをEBVイムノポジティブ患者の血清でスクリーニングするものであり、他の分析法とは、明らかに異なるものである。EBV遺伝子発現についてのほとんどの研究は、セルカルチャーでのウイルスの増殖及び維持に基づくものであるが、本発明で用いた実験デザインはin vivoでの状態を反映したものである。免疫学的検出法及び核酸ハイブリダイゼーションを組合わせて用い

て、in vivoで発現され抗原性を示すと考えられる7個のDNAフラグメントを単離した。更に他のDNAフラグメントも同様に単離した。ここで同定した7個のEBV抗原は、EBV抗原として既に報告されている蛋白質の1部ではなく、またサンプル中のEBVに対する抗体の存在を診断するのに使用できるものである。これらの抗原の存在、レベル及びクラスとEBVによる病理との関係を明らかにするには、詳細な臨床研究が必要である。

第6図に示すように、EBV B95-8の大きな内部反復配列は、ウイルスにおいて約11回繰返されており、その結果、上記で示した配列(A)-(D)のいずれをもそれと同定するのが不可能である。しかしながら、CLBとCLDの終止コドンが有効に作用するとすれば、CLAからCLDのすべてから得られるフラグメントは異なるORFの1部である。3個の異なるリーディングフレームが使用されている。EBV領域でのスプライシングの今日の知識 [Bodescot, H., et

al., (1984, 1986) supra; Speck, S. と Strominger J., (1985) supra; Speck et al., (1986) supra; Sample, J. et al., (1986) supra] から判断して、これらのクローンのいくつかは同じ蛋白質の異なる部分をコードしている可能性がある。

クローンCLBとCLCの2つは、重複配列を有している。これらは異なるORFにあるので、異なる蛋白質の1部を発現しているものと考えられる。このことは、同じ配列は異なるスプライシングパターンから恐らく生じる異なるエクソンの1部であることを示している。EBV蛋白質によってエクソンがこのように共有されていることは、EBNA蛋白質のいくつかについて既に報告されている (Bodescot, H. et al., (1984) supra)。本発明により、これはこのような系に共通に生じるものと考えられる。反復領域は全てが同様にスプライスされるものではなく、このように反復領域には特有の多様性が存在することを考慮に入れてこの事実を考える時、ORFは実際

に発現される場合もあり、時々発現される場合もあり、また決して発現されない場合もあるとさええる。

前記した実験デザインからして、CLBの1部の蛋白質があるグループの細胞あるいは組織で発現され、CLCを含む蛋白質が他のグループの細胞あるいは組織で発現される可能性がある。両者が抗原性を示す場合には、本発明で使用した血清は両者に対する抗体を有することになる。プールした血清ではなく個々の血清を用いてコロニーのEBV抗原の免疫学的検出を行なった所、クローンCLA-CLFについて得られた結果には検出可能なほどの相違は見られず、いくらかの変動はCLGについて観察された(第7図)。しかしながら、ウイルスの他の領域を用いたEBV抗原発現クローンでの結合レベルはかなり変動していた(結果は示されず)。

上記の実験から、伝染性単核症ではEBVによってDNA配列(A)-(G)が発現されていることが示される。EBVを保持したセルラインB95-

B、Raji及びNamalwa から調製したRNAのノーザンブロット分析では、ラージ内部反復配列のPvuII-BamHIサブフラグメントあるいはCLFで見られる配列と相同性を示す転写体は検出できなかった。また、EBV B95-8セルラインのポリアデニル化細胞質RNAから調製したcDNAバンクからは、この領域の配列を含むクローンは単離されなかった。このEBV B95-8セルラインはH. Perricaudetから入手したものである[Bodescot et al., (1984, 1986) supra]。これらの結果を全て考え合わせると、本発明のウイルス配列CLA-CLD及びCLFは1つのグループの細胞又は組織で発現され、EBVの発現を調節する同様の一連の因子をセルカルチャーは持つていないことが判る。あるいはまた、本発明の配列を発現するEBV株は血清源として対象となつた人々に広く存在していることを示している。EBV B95-8 DNAを保持しているセルラインのmRNAを用いた同様の実験では、CLEとCLGの両者が対応する

反復配列自体がいくつかの異なる蛋白質をコードしていることを示している。7個の発現エビドープが、それぞれ独立の伝染性単核症において同時に存在していることが示された。これらの(CLA-CLD及びCLF)エビドープの多くは、これまで報告されておらず、また本発明で用いた如き実験に基いたものではない。本発明の実験はin vivoでの状態を反映したものである。

本発明により調製されるDNA配列(A)-(G)はいずれも、既に報告されているEBNA蛋白質の1部をコードするものではなく、CLA-CLDは、内部反復領域の主要部にわたるスプライスされた転写体に対応するこれまでに報告されているcDNAのいずれにも存在しない。B95-8 RNAから調製されたcDNAバンクではそれらが検出されなかったことは、それらはヒトの体内でin vivoで発現されるものであつて、セルカルチャーでの条件下では発現されないことを示している。

4. 図面の簡単な説明

cDNA配列をポジティブに同定した。

上記したように、本発明に従つて、E. coli発現ベクターを用いてラージEBV B95-8ゲノムDNAバンクを調製し、ヒトIA患者から得た血清プールでスクリーニングした。かくして得られるイムノポジティブクローンを、W領域用プローブでスクリーニングした。ウイルスラージ内部反復配列の配列も含むイムノポジティブクローン4個、及びEBVの他の領域から調製したイムノポジティブクローン3個を選択した。

BamHI Wオープンリーディングフレーム(ORF)の免疫学的に検出される生成物をコードする上記4個のクローンについてDNA配列を分析した所、それらをコードするDNA配列は反復配列上にあり、それらは3つのオープンリーディングフレームに由来しており、そしてそれらのうちの2つは前記したように重複したリーディングフレームから構成されていることが判つた。このことは、イントロン/エクソンスプライシングが生じていることを示しており、あるいはまた、

第1図のAは、EBV B95-8ゲノムを直線的に示す。

第1図のBは、EBV B95-8ウイルスゲノムのBamHI制限酵素地図を直線的に示す。

第2図は、クローン化EBV DNAフラグメントを含む発現ベクターpORF1を示す。

第3図は、EBV B95-8ゲノムバンクのスクリーニングによつて単離されるイムノポジティブクローンを示す写真である。

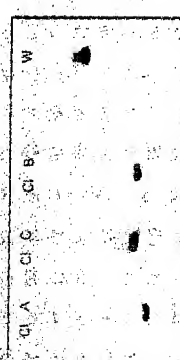
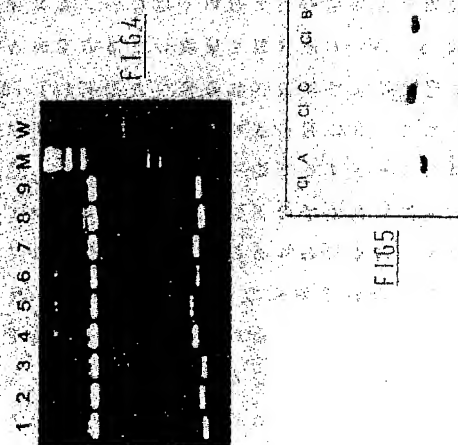
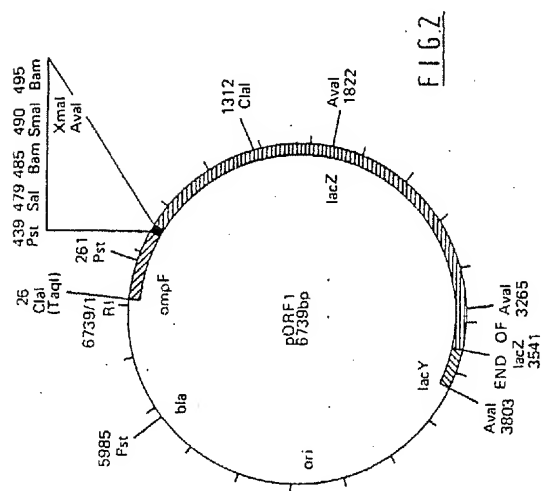
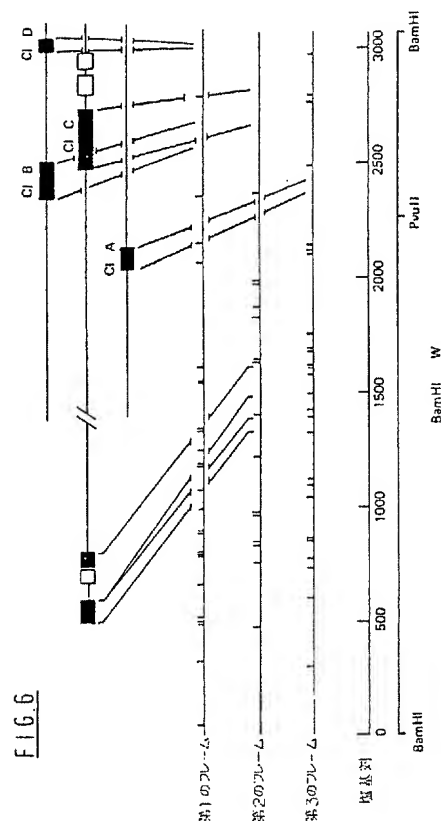
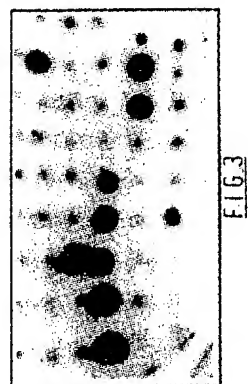
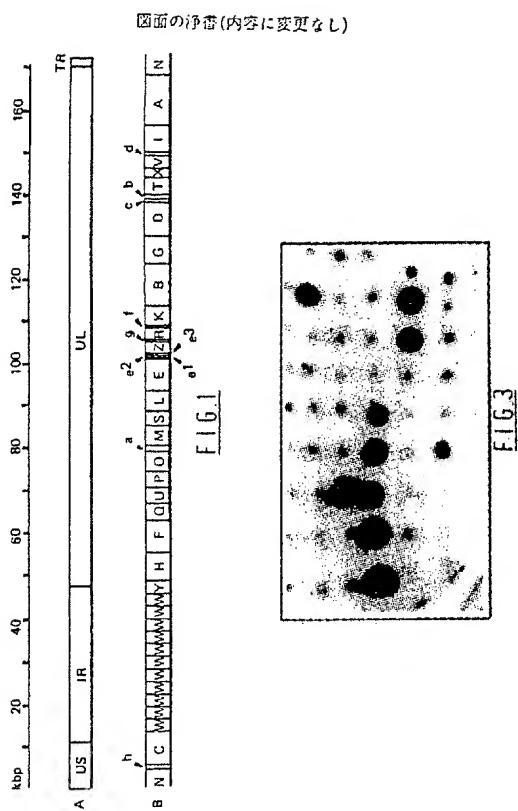
第4図は、イムノポジティブクローンから得られるプラスミドDNAを示す写真である。

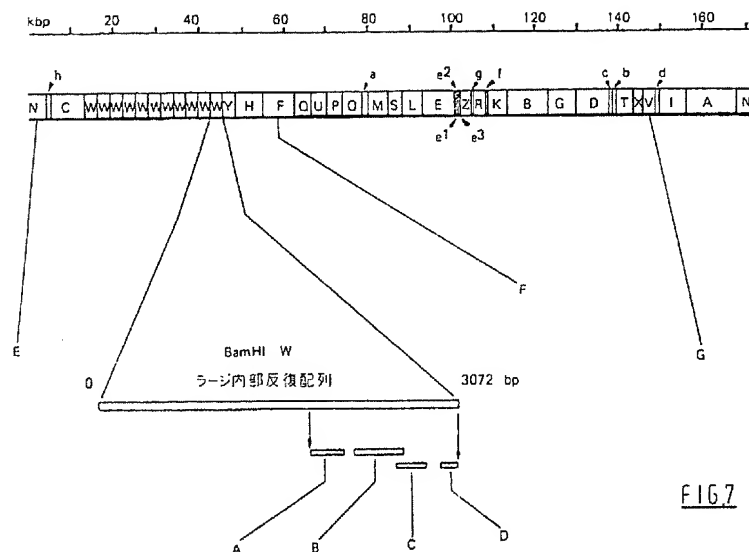
第5図は、第4図のプラスミドDNAのサザンブロット分析の結果を示す写真である。

第6図は、EBV B95-8 BamHI Wフラグメントのシングルコピーを示す。

第7図は、EBV B95-8ゲノムを直線的に示す。

代理人 浅 村 銘





第 1 頁の続き

⑤Int. Cl.⁵

C 07 K 7/06

7/08

7/10
15/12

1/20

15/38

C 12 P 21/02
G 01 N 33/569

11(C 12 N 1/20

C 12 R 1:19
(C 12 R 21/02

C 12 P 21/02
C 12 R 1:19

識別記号

庁内整理番号

ZNA Z

8318-4H

8318-4H
8318-4H

8318-4H
8318-4H

8515-4B

G

C

6712-4B
7000 00

7906-2G

⑦② 発 明 者

ダーモット フェリツ

クス ジェラード ウ

オールズ

アイルランド国 ガルウェイ (番地なし), ユニバーシティ

テイ カレッジ ガルウェイ, デパートメント オブ マ

イクロバイオロジー気付

手続補正書 (自発)

平成
昭和 1 年 1 月 18 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和 63 年特許願第 284820 号

2. 発明の名称

抗原の同定法、そのアッセイ法
及びそれを含むワクチン

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住 所
氏 名
(名 称)

ジー ジーン ガルウェイ リミテッド

4. 代 理 人

居 所

〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング 331
電 話 (211) 3651 (代表)

氏 名

(6669) 浅 村 皓

5. 補正命令の日付

昭和 年 月 日

6. 補正により増加する発明の数

7. 補正の対象

明 細 書

8. 補正の内容

別紙のとおり

明細書の浄書(内容に変更なし)

手 続 補 正 様式(方式)

平成 1 年 3 月 27 日

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和 63 年 特許願第 284820 号

2. 発明の名称

抗原の同定法、そのアッセイ法及びそれを含むワクチン

3. 補正をする者
事件との関係 特許出願人
氏名(名称)

ジー ジーン ガルウェイ リミテッド

4. 代 理 人

居 所 〒100 東京都千代田区大手町二丁目2番1号
新大手町ビルディング 331
電 話 (211) 3651 (代表)
氏 名 (6669) 浅 村 皓

5. 補正命令の日付 平成 1 年 3 月 7 日

6. 補正により増加する請求項の数

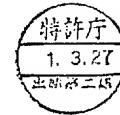
7. 補正の対象

願書の特許出願人の住所の欄

願書の特許出願人(法人)代表者氏名の欄

代理権を証明する書面

図面



8. 補正の内容 別紙のとおり

願書に最初に添付した図面の浄書(内容に変更なし)